

PCT/EP03/12833

REC'D 14 JAN 2004

WIPO

PCT



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGIA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

## CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200202663 , que tiene fecha de presentación en este Organismo el 20 de Noviembre de 2002

Madrid, 22 de Agosto de 2003

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica.

P.D.

CARMEN LENCE REIJA

*Diligencia para tener constancia de que el u. correcto de patente es P200202663*

200202663

Oficina Española de Patentes y Marcas

EXPEDIENTES

20 NOV 2009

200202663

200202663

200202663

(1) MODALIDAD: <input checked="" type="checkbox"/> <b>PATENTE DE INVENCION</b> <input type="checkbox"/> <b>MODELO DE UTILIDAD</b>		(2) TIPO DE SOLICITUD: <input type="checkbox"/> ADICION A LA PATENTE <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> PCT: ENTRADA FASE NACIONAL		(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN: MODALIDAD N° SOLICITUD FECHA SOLICITUD		FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LA O.E.P.M. <b>02 NOV 20 -9 :30</b>		FECHA Y HORA PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.		(4) LUGAR DE PRESENTACION: <b>MADRID</b>		CODIGO <b>28</b>			
(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACION SOCIAL <b>LABORATORIOS HIPRA, S.A.</b>				NOMBRE		NACIONALIDAD <b>española</b>		CODIGO PAIS <b>ES</b>		DNI/CIF <b>A/28063675</b>		CNAE <b></b>		PYME <b></b>	
(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE: DOMICILIO <b>Avenida de la Selva, 135</b> LOCALIDAD <b>AMER</b> PROVINCIA <b>GERONA</b> PAIS RESIDENCIA <b>España</b> NACIONALIDAD <b>española</b>						TELÉFONO FAX CORREO ELECTRÓNICO CÓDIGO POSTAL <b>17170</b> CÓDIGO PAIS <b>ES</b> CÓDIGO PAIS <b>ES</b>									
(7) INVENTOR (ES): <b>1/ Piñol Ribas</b> <b>2/ Bru Virall</b> <b>3/ Espuña Masó</b>		APELLIDOS		NOMBRE <b>Jaume</b> <b>Seraí</b> <b>Enric</b>		NACIONALIDAD <b>española</b> <b>española</b> <b>española</b>		CODIGO PAIS <b>ES</b> <b>ES</b> <b>ES</b>							
(8) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR				(9) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO: <input type="checkbox"/> INVEN. LABORAL <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION											
(10) TÍTULO DE LA INVENCION: <b>VACUNA VIVA ATENUADA CONTRA LA PLEURONEUMONIA PORCINA.</b>															
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO															
(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR    FECHA															
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAIS DE ORIGEN				CODIGO PAIS		NUMERO		FECHA							
(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES <input type="checkbox"/>															
(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCION POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CODIGO) (RELLENASE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES) <b>Eduardo FERREGÜELA COLÓN - calle Provença, 304 - 08008 BARCELONA (España) - Agente 545-2</b>															
(16) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN: <input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION N° DE PAGINAS: <b>29</b> <input checked="" type="checkbox"/> N° DE REVINDICACIONES: <b>12</b> <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. N° DE PAGINAS: <b>6</b> <input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS N° DE PAGINAS: <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD								FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE  <b>Colegiado 402</b> (VER COMUNICACION)							
NOTIFICACION SOBRE LA TASA DE CONCESION: Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.								FIRMA DEL FUNCIONARIO  							



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P2002026 63

FECHA DE PRESENTACIÓN

## RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

**"Vacuna viva atenuada contra la pleuroneumonía porcina"**

La presente invención se refiere a un método para obtener una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* inmunógena y no hemolítica modificada al menos en un segmento del gen *apxIA* y eventualmente en un segmento del gen *apxIIA*, que codifican un dominio transmembrana de las exotoxinas *ApX* hemolíticas y citolíticas. También se refiere a las cepas obtenidas, y a la vacuna viva atenuada obtenida con ellas contra la pleuroneumonía porcina.

GRÁFICO

BEST AVAILABLE COPY

(VER INFORMACIÓN)



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

12

## SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

P 20 02 026 63

21 NÚMERO DE SOLICITUD  
P 20 02 026 63

22 FECHA DE PRESENTACIÓN  
20 NOV. 2002

62 PATENTE DE LA QUE ES  
DIVISORIA

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

71 SOLICITANTE (S)

LABORATORIOS HIPRA, S.A.

DOMICILIO Avenida de la Selva, 135 - 17170 AMER (España)

NACIONALIDAD española

72 INVENTOR (ES) 1/ Jaume Piñol Ribas  
3/ Enric Espuña Masó

2/ Sergi Bru Virgili  
4/ Enrique Querol Murillo

51 Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54 TÍTULO DE LA INVENCION

VACUNA VIVA ATENUADA CONTRA LA PLEURONEUMONIA  
PORCINA.

57 RESUMEN

"Vacuna viva atenuada contra la pleuroneumonía porcina"

La presente invención se refiere a un método para obtener una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* inmunógena y no hemolítica modificada al menos en un segmento del gen *apxIA* y eventualmente en un segmento del gen *apxIIA*, que codifican un dominio transmembrana de las exotoxinas *Apx* hemolíticas y citolíticas. También se refiere a las cepas obtenidas, y a la vacuna viva atenuada obtenida con ellas contra la pleuroneumonía porcina.

BEST AVAILABLE COPY

## VACUNA VIVA ATENUADA CONTRA LA PLEURONEUMONIA PORCINA

### Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a un método para obtener una cepa modificada de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, inmunógena y no hemolítica, útil para preparar una vacuna viva atenuada contra la pleuroneumonía porcina.

### Estado de la técnica anterior

- 10 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (en adelante, "App") es una bacteria Gram-negativa causante de la pleuroneumonía porcina, enfermedad infecciosa respiratoria, de distribución mundial, responsable de grandes pérdidas económicas en la industria porcina.

- 15 Los factores de virulencia más importantes de App son proteínas extracelulares: las exotoxinas Apx. Estas exotoxinas pertenecen a la familia de toxinas formadoras de poros denominadas RTX, ampliamente distribuidas entre las bacterias patógenas Gram-negativas. Las principales exotoxinas en App son las siguientes: ApxI, ApxII, ApxIII, y ApxIV.

- 20 Las exotoxinas ApxI y ApxII son hemolíticas y citolíticas. La ApxI tiene una actividad hemolítica y citolítica fuerte y la ApxII una actividad hemolítica débil y una actividad citolítica moderada.

- 25 Si bien todos los serotipos analizados son capaces de producir ApxIV, existe una distribución característica de serotipo para la expresión del resto de exotoxinas Apx. Los serotipos 1, 5, 9 y 11 producen las exotoxinas ApxI y ApxII; el serotipo 10 produce tan sólo la ApxI; los serotipos 7 y 12 producen solamente la ApxII y los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 producen la ApxII y la ApxIII.

- 30 Los genes correspondientes a las exotoxinas ApxI y ApxII están organizados en forma de operón. El operón de la exotoxina ApxI dispone de cuatro genes: *apxIC*, *apxIA*, *apxIB* y *apxID*. El gen *apxIA* codifica para la exotoxina ApxI propiamente dicha. El gen *apxIC* codifica una proteína activadora (acilasa) que se encarga de introducir una modificación post-traducciona en la ApxI (acilación) que permite que la ApxI adquiera la conformación activa, capacitándola para la interacción con los receptores celulares específicos del huésped. Los genes *apxIB* y *apxID* codifican

dos proteínas de membrana que se encargan de secretar la exotoxina ApxI madura al medio externo.

El operón de la ApxII dispone sólo del gen A (*apxIIA*) y del gen C (*apxIIC*), que codifican respectivamente para la ApxII y para la acilasa encargada de que la ApxII adquiera su conformación activa. Existe también un pequeño fragmento que muestra similitud con el gen *apxIB*, pero que no da lugar a ninguna proteína funcional. La exportación de la ApxII madura al medio externo se realiza gracias a las proteínas codificadas por los genes *apxIB* y *apxID*.

Los métodos actuales de vacunación no proporcionan una protección completa frente a todos los serotipos de App.

En la solicitud de patente WO97/16532A1 se describe la obtención de una cepa vacunal de App capaz de inducir una respuesta inmunológica en un animal que comprende un organismo modificado que produce una toxina Apx inactivada parcial o totalmente debido a la delección parcial, por mutagénesis inducida, de un gen estructural *apxIA* y/o a la delección parcial de un gen activador *apxIIC*. No modifica la zona transmembrana.

En la solicitud de patente EP810283A2 se describe la obtención de una cepa vacunal de App modificada en el gen *apxIC* de manera que no produce la proteína activadora en forma funcional y ésta no puede activar la toxina por acilación. Tampoco modifica la zona transmembrana.

Jansen *et al*; Infection and Immunity 63:27-37 (1995), describe la producción de recombinantes homólogos de App mediante mutagénesis dirigida. Los mutantes tienen el gen *apxIA* inactivado por inserción del gen *CMr* y/o el gen *apxIIA* inactivado por inserción del gen *TETr*.

Tascón *et al*; Molecular Microbiology 14:207-216 (1994), describe dos mutantes de App. Uno de ellos tiene una disrupción en el gen *apxIBD* y el otro una disrupción en el gen estructural *apxIA*.

Reimer *et al*; Microbial Patogenesis 18:197-209 (1995), describe un mutante avirulento de App que, por mutación química, tiene delecciones que afectan partes importantes del operón *apxIABCD*. Este mutante no sintetiza la toxina ApxI, pero sí la ApxII, aunque no la secreta de la célula.

Las cepas que no expresan las exotoxinas ApxI y ApxII, no pueden ser utilizadas como vacuna atenuada porque dan lugar a respuestas inmunes no protectoras,

debido a que las exotoxinas ApxI y ApxII son uno de los factores más importantes determinantes de la virulencia de App,

Prideaux, *The 16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, 17-20 Sept. 2000, p. 439-442, describe una vacuna preparada a partir de una cepa que tiene inactivado el gen *apxIIC* y que expresa y secreta una toxina ApxII no activada, incapaz, por tanto, de unirse a las células diana.

Así, las vacunas vivas atenuadas descritas en el estado de la técnica anterior basadas en cepas de App sin capacidad hemolítica, son menos inmunoprotectivas porque han sufrido modificaciones en su estructura que no les permiten unirse al receptor de membrana de las células diana o porque no pueden generar anticuerpos frente a las toxinas ApxI y/o ApxII, al no ser secretadas por la célula.

Frey *et al*; Gene 142:97-102 (1994) describe la secuencia de aminoácidos de la exotoxina ApxI procedente de una cepa de serotipo 1, y Smits *et al*; Infect.Immun. 59:4497-4504 (1991) describe la secuencia de aminoácidos de la exotoxina ApxII de una cepa de serotipo 9.

### Resumen de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto un método para obtener una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* inmunógena y no hemolítica, a partir de una cepa virulenta de App, modificada al menos en un segmento del gen *apxIA* y eventualmente en un segmento del gen *apxIIA*, que codifican un dominio transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas.

Esta cepa no tiene actividad hemolítica, pero mantiene la capacidad inmunoprotectora inalterada, y es útil para preparar una vacuna viva atenuada contra la pleuroneumonía porcina.

Los dominios transmembrana de las exotoxinas ApxI y ApxII juegan un papel importante en la formación del poro en la membrana de la célula diana. Una vez formado este poro, se producen desequilibrios osmóticos que acaban finalmente produciendo la lisis de la célula diana.

Sorprendentemente se ha encontrado que la vacuna viva atenuada preparada con esta cepa modificada de App puede ser aplicada a bajas dosis, que contiene las toxinas ApxI y ApxII de App sin capacidad hemolítica y que contiene todos

los antígenos inmunológicamente necesarios para obtener una respuesta inmunógena elevada.

El objeto de la presente invención es un método para obtener una cepa de App inmunógena y no hemolítica, a partir de una cepa virulenta de App, modificada al menos en un segmento del gen *apxIA* y eventualmente en un segmento del gen *apxIIA*, que codifican un dominio transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas.

En un segundo aspecto la invención tiene también por objeto las cepas obtenibles mediante el método objeto de la invención y a las vacunas preparadas con las mismas.

En un tercer aspecto la invención tiene también por objeto las cepas de App depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo con los números de registro CECT 5985 y CECT 5994.

## 15 Descripción de las figuras

### Figura 1

En la figura 1 muestra una alineación realizada mediante el programa ClustalX (Thompson *et al*; Nucleic Acids Research 24:4876-4882 (1997)) entre las secuencias de aminoácidos de la ApxI procedente de una cepa de serotipo 1 (Frey *et al*; Gene 142:97-102 (1994)) y la ApxII de una cepa de serotipo 9 (Smits *et al*; Infect.Immun. 59:4497-4504 (1991)). En la figura se ha incluido sólo la secuencia situada entre los aminoácidos 1 a 594 de la ApxI y 1 a 590 de la ApxII. Sobre la alineación se encuentran enmarcadas las regiones H1 (aminoácidos 233 a 253), H2 (aminoácidos 296 a 315) y H3 (aminoácidos 369 a 405). Estas regiones corresponden respectivamente a los tres dominios transmembrana presentes en ambas Apx.

### Figura 2

La figura 2 muestra un esquema con los pasos seguidos hasta la obtención del plásmidos híbridos pApxIAH2 y pApxIIAH2. En primer lugar, el plásmido pGP1 se obtuvo mediante digestión del plásmido pGP704 (Miller y Mekalanos; J.Bact. 170:2575-2583 (1988)) con los enzimas de restricción *EcoRI* y *BglIII* y posterior ligación con los oligonucleótidos pGP5' y pGP3'. Este plásmido consta del origen de replicación vegetativo del plásmido R6K (Ori R6K), del origen de transferencia por conjugación del plásmido RP4 (OriT RP4) y del gen de resistencia a ampicilina (*bla*). El



plásmido pGP1 fue digerido con el enzima de restricción *Pst*I y ligado con un fragmento *Pst*I portador de un gen de resistencia a Kanamicina (*Km<sup>r</sup>* o *kan*) procedente del plásmido pUC4K para dar lugar al plásmido pGP2. En este plásmido, previamente digerido con el enzima de restricción *Eco*RI y defosforilado, se insertaron tres  
 5 fragmentos de DNA amplificados mediante PCR: el promotor *ptac*, la región codificante de la fusión *atpE*/GFPUV (región de unión al ribosoma del gen de *E. coli* *atpE* fusionada con la variante ultravioleta de la proteína fluorescente verde) y el terminador de la transcripción *rrnB*. El plásmido resultante fue nombrado pGP3. En este último plásmido se insertaron las regiones flanqueantes 5' y 3' (amplificadas mediante  
 10 PCR) que codifican para la segunda hélice transmembrana de los genes *apxI* y *apxII* para dar lugar, respectivamente, a los plásmidos pAp<sub>x</sub>IAH2 y pAp<sub>x</sub>IIAH2.

### Figura 3

La figura 3 está dividida en tres paneles. En el panel A se muestran los mapas de  
 15 restricción (en kilobases, kb) y la distribución de los genes en el operón *apxI* situado en el genoma de App. En gris claro se indica el gen *apxIA*, diana de los diferentes sucesos de recombinación y en gris oscuro los genes adyacentes *apxIC*, *apxIB* y *apxID*; Los diferentes genes o regiones del plásmido pAp<sub>x</sub>IAH2 están dibujados mediante barras oblicuas. Los segmentos codificantes de las hélices transmembrana (H1, H2 y H3) de  
 20 *apxIA* están resaltados en negro. Por razones de espacio, se han simplificado los nombres y algunas estructuras detalladas en los plásmidos de la figura 2. Así, *gfpUV* agrupa el promotor *ptac* y la fusión *atpE*/GFPUV, OriV indica el origen de replicación vegetativo de R6K y OriT el origen de transferencia por conjugación de RP4. En (1) y (3) se muestra el mapa de restricción con el enzima *Xho*I y la distribución de los genes del operón *Ap<sub>x</sub>I* del genoma de App. En (2) se muestra el mapa de restricción del mismo operón después de la inserción del plásmido pAp<sub>x</sub>IAH2 en el genoma de App. Esta inserción se produce mediante un único suceso de recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes 5' de H2 situadas respectivamente en el plásmido pAp<sub>x</sub>IAH2 y el genoma de App. En (4) se muestra el mapa de restricción de este operón después de la resolución del plásmido insertado en (2) mediante una segunda recombinación entre  
 25 las dos regiones flanqueantes 3' de H2 situadas en el genoma de App.  
 30

El panel B de la figura 3 muestra el resultado de la hibridación de una sonda del gen *apxIA* con una transferencia Southern de los DNAs genómicos digeridos

con *XhoI* y obtenidos a partir de cultivos de: 1) HP816 NI<sup>r</sup>; 2) recombinante obtenido por inserción del plásmido pAp $\alpha$ IIH2 en el genoma de App mediante un único suceso de recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes 5' de H2 (HP816R1); 3) recombinante obtenido a partir de HP816R1 que recupera el mismo fenotipo que la cepa paterna HP816 NI<sup>r</sup> y 4) recombinante obtenido a partir de HP816R1 que recupera el mismo fenotipo que la cepa paterna HP816 NI<sup>r</sup> con la excepción de que muestra la misma actividad hemolítica que HP816R1 (AppAp $\alpha$ IIH2).

El panel C de la figura 3 muestra el aspecto de colonias sembradas a partir de los mismos cultivos descritos en el panel B (1, 2, 3 y 4) junto a otra colonia procedente de un cultivo de App serotipo 7 (5). Las colonias fueron sembradas en placas de agar sangre columbia suplementado con NAD 0,004% (CA) o en placas de TSYN suplementadas con kanamicina 25  $\mu$ g/mL (TS). Obsérvese en CA la presencia de grandes halos hemolíticos alrededor de las colonias de los cultivos 1 y 3 y de halos hemolíticos pequeños alrededor de las colonias en los cultivos 2, 4 y 5. Nótese también la ausencia de crecimiento en TS de los cultivos 1, 3, 4 y 5.

#### Figura 4

La figura 4 está dividida en tres paneles. El panel A se muestran los mapas de restricción (en kb) y la distribución de los genes en el operón *apxII* situado en el genoma de App. En gris claro se indica el gen *apxIIA*, diana de los diferentes sucesos de recombinación y en gris oscuro los genes adyacentes *apxIIC*, *apxIIB*; Los diferentes genes o regiones del plásmido pAp $\alpha$ IIH2 están dibujados mediante barras oblicuas. Los segmentos codificantes de las hélices transmembrana (H1, H2 y H3) de *apxIIA* están resaltados en negro. En (1) y (3) se muestra el mapa de restricción con el enzima *EcoRI* y la distribución de los genes del operón *Ap $\alpha$ II* del genoma de App. En (2) se muestra el mapa de restricción del mismo operón después de la inserción del plásmido pAp $\alpha$ IIH2 en el genoma de App. Esta inserción se produce mediante un único suceso de recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes 3' de H2 situadas respectivamente en el plásmido pAp $\alpha$ IIH2 y el genoma de App. En (4) se muestra el mapa de restricción de este operón después de la resolución del plásmido insertado en (2) mediante una segunda recombinación por las regiones flanqueantes 5' de H2 situadas en el genoma de App.

El panel B de la figura 4 muestra el resultado de la hibridación de una sonda del gen *apxIIA* con una transferencia Southern de los DNAs genómicos digeridos con *EcoRI* y obtenidos a partir de cultivos de: 1) HP816 NI<sup>r</sup>; 2) recombinante obtenido por inserción del plásmido pAp<sub>xII</sub>ΔH2 en el genoma de App mediante un único suceso de recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes: 5' de H2 (HP816R2); 3) recombinante obtenido a partir de HP816R2 que recupera el mismo fenotipo que la cepa paterna HP816 NI<sup>r</sup>; 4) recombinante obtenido a partir de HP816R2 que recupera el mismo fenotipo que la cepa paterna HP816 NI<sup>r</sup> con la excepción de que muestra la misma actividad hemolítica que HP816R2 (AppAp<sub>xI/II</sub>H2<sup>-</sup>).

El panel C de la figura 4 muestra el aspecto de colonias sembradas a partir de los mismos cultivos descritos en el panel B (1, 2, 3 y 4). Las colonias fueron sembradas en placas de agar sangre columbia suplementado con NAD (CA) o en placas de TSYN suplementadas con kanamicina 25 µg/mL (TS). Obsérvese en CA la presencia de pequeños halos hemolíticos alrededor de las colonias de los cultivos 1 y 3 y la ausencia de halos hemolíticos alrededor de las colonias en los cultivos 2 y 4. Nótese también la ausencia de crecimiento en TS de los cultivos 1, 3 y 4.

#### Figura 5

La figura 5 muestra tres gráficas con las curvas de crecimiento, representadas (símbolos oscuros) a partir de los valores de la absorbancia a 600 nm de los diferentes cultivos a intervalos de una hora (eje de ordenadas izquierdo). De manera paralela también se tomaron muestras del sobrenadante de los cultivos en los mismos intervalos de tiempo. Estas muestras fueron mantenidas a 0 °C hasta el momento de ser diluidas 1/50 en tampón carbonato (pH 9,6). Después fueron aplicadas a pocillos para cuantificar la presencia de Ap<sub>xI</sub> o Ap<sub>xII</sub> mediante ELISA y utilizando un anticuerpo monoclonal específico para cada Ap<sub>x</sub>. A partir de los valores de absorbancia a 405 nm de cada muestra ensayada (eje de ordenadas derecho) se construyeron las curvas que representan la acumulación de cada una de las Ap<sub>x</sub>s a lo largo del tiempo (símbolos claros). En (A) mediante triángulos un cultivo de HP816 NI<sup>r</sup> y mediante círculos un cultivo de AppAp<sub>xII</sub>H2<sup>-</sup>; los símbolos claros muestran la acumulación de Ap<sub>xI</sub>. En (B) mediante triángulos un cultivo de HP816 NI<sup>r</sup> y mediante círculos un cultivo de AppAp<sub>xI/II</sub>H2<sup>-</sup>; los símbolos claros muestran la acumulación de Ap<sub>xII</sub>. En (C) mediante triángulos un cultivo de HP816RI y mediante círculos un cultivo de HP816R2; los triángulos claros

muestran la acumulación de ApxI y los círculos claros muestran la acumulación de ApxII.

#### Figura 6

- 5 En (A) se muestra una tinción con azul de Coomasie de una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con muestras de los sobrenadantes de cultivos de 5 horas de 1) HP816 N<sup>r</sup>; 2) AppApxIIH2<sup>-</sup>; 3) un control obtenido a partir de una cepa de serotipo 4 de App (el serotipo 4 de App produce y excreta la ApxII de 105 kD y ApxIII de 115 kD pero no la ApxI); y M) marcador de masa molecular (se encuentran indicadas las bandas relevantes de 110 y 120 kD). En (B) se encuentra una transferencia tipo Western de un gel con muestras idénticas a las analizadas en el gel de (A) detectadas mediante un anticuerpo monoclonal específico para la ApxI. En (C) se encuentra una transferencia tipo Western de un gel con muestras idénticas a las analizadas en el gel de (A) con la excepción del carril 2, que contiene una muestra del sobrenadante de un cultivo AppApxI/IIH2<sup>-</sup>. No se incluye una fotografía del gel ya que la distribución de bandas es idéntica a la que aparece en el gel de (A). Esta transferencia fue revelada mediante un anticuerpo monoclonal específico para la ApxII. Obsérvese que la banda de 105 kD del carril 3 aparece detectada sólo en (C).

#### 20 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un método para obtener una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* inmunógena y no hemolítica, a partir de una cepa virulenta de App, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- se determinan los dominios transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas
- se modifica al menos un segmento del gen *apxIA* y eventualmente un segmento del gen *apxIIA*, que codifican un dominio transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas

El término inmunógena se refiere a que la cepa de App, obtenida con el método de la presente invención, mantiene inalterada su capacidad inmunoprotectora, es decir, contiene todos los antígenos inmunológicamente necesarios para obtener una respuesta inmunógena elevada en el huésped.

El término no hemolítica se refiere a que la cepa de App obtenida con el método de la presente invención, no tiene actividad hemolítica, resultando ser una cepa avirulenta.

La elección de una cepa virulenta de App obtenida de animales infectados que padezcan la enfermedad, se realiza según los métodos que el experto en la materia conoce suficientemente.

La primera etapa consiste en determinar los dominios transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas mediante el uso de los programas TransMem (Aloy *et al*; Comp.Appl.Biosc. 13:213-234 (1997)) o Helixmem (Eisenbeg *et al*; J.Mol.Biol. 179:125-142 (1984)) que analiza la secuencia de aminoácidos de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas, tal y como se describe para *Escherichia coli* en Ludwig *et al*; Mol.Gen.Genet. 226:198-208 (1991).

La segunda etapa consiste en modificar al menos un segmento del gen *apxIA* y eventualmente un segmento del gen *apxIIA*, que codifican un dominio transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas.

El término modificar se refiere a la modificación de un gen, bien sea mediante el uso de las técnicas convencionales de DNA recombinante que incluyen: la sustitución de uno o varios nucleótidos, la inserción de uno o varios nucleótidos, la delección parcial o total de un gen, o bien mediante la disrupción, por mutagénesis inducida químicamente o inducida por radiación.

En una realización preferida, la modificación es llevada a cabo mediante la delección en al menos un segmento del gen *apxIA* y eventualmente en un segmento del gen *apxIIA*, que codifican un dominio transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas.

Los dominios transmembrana presentes en el gen *apxIA* y en el gen *apxIIA* de las exotoxinas hemolíticas y citolíticas fueron detectados mediante el uso de los programas Transmem y Helixmem, mencionados anteriormente. La predicción realizada sobre las secuencias de aminoácidos de las exotoxinas hemolíticas y citolíticas ApxI y ApxII indica que los dominios transmembrana, también denominados transmembranas, se encuentran localizados en las siguientes zonas de la secuencia de las exotoxinas:

- Primer dominio transmembrana H1: entre los aminoácidos 233 y 253, correspondiente a los nucleótidos 699 a 759

- Segundo dominio transmembrana H2: entre los aminoácidos 296 a 315, correspondiente a los nucleótidos 888 a 945
- Tercer dominio transmembrana H3: entre los aminoácidos 369 a 405, correspondiente a los nucleótidos 1107 a 1215

5 En una realización más preferida, la modificación es llevada a cabo mediante una delección en el segmento del gen *apxIA*, que codifica el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxI de App.

Preferiblemente la modificación es llevada a cabo mediante la delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIA*, que codifican el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxI de App.

10 Es otra realización preferida del método objeto de la presente invención la que introduce además una delección en el segmento del gen *apxIIA*, que codifica el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxII de App. Preferiblemente una delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIIA*, que codifican el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxII de App.

15 En la forma de realización preferida de la presente invención, que se describirá con todo detalle en el apartado de Ejemplos, la obtención de una cepa de App inmunógena no hemolítica se ha realizado mediante un proceso que ha seguido las siguientes etapas:

20 A. Elección de una cepa virulenta de App.

B. Predicción de las hélices alfa del dominio transmembrana de las proteínas ApxI y ApxII con objeto de diseñar una construcción nucleotídica que permita la delección en el segundo dominio transmembrana de ambas proteínas, sin que se vea afectado el proceso de plegamiento y la capacidad de las hemolisinas resultantes para interaccionar con los receptores específicos de membrana.

25 C. Construcción de un vector de clonación capaz de integrarse en el genoma de App y que disponga de genes marcadores que permitan monitorizar de manera eficiente la integración de dicho vector.

30 C.1. Construcción del plásmido híbrido pGP3 que consta de un origen de replicación RK6, el origen de transferencia de RP4 y un gen de resistencia a kanamicina. Además se incluyó el gen de la proteína autofluorescente GPVUV bajo el control del promotor ptac y el terminador rrnB. También se modificó el lugar de clonaje múltiple para facilitar la posterior inserción de secuencias de DNA.

C.2. Construcción de un vector de clonación híbrido que contenga las secuencias flanqueantes 5' y 3' de la segunda hélice transmembrana especificada por el gen *apxIA*. Para ello se construyó el plásmido híbrido pAp<sub>xIA</sub>H2 con objeto de seleccionar y clonar dichos fragmentos adyacentes a los extremos 5' y 3' del segmento que codifica la segunda hélice transmembrana en el gen *apxIA*. Este plásmido fue utilizado como vector final para la transformación de App.

C.3. Construcción de un vector de clonación híbrido que contenga las secuencias flanqueantes 5' y 3' de la segunda hélice transmembrana especificada por el gen *apxIIA*. Para ello se construyó el plásmido híbrido pAp<sub>xIIA</sub>H2 con objeto de seleccionar y clonar dichos fragmentos adyacentes a los extremos 5' y 3' del segmento que codifica la segunda hélice transmembrana en el gen *apxIIA*. Este plásmido fue utilizado como vector final para la transformación de App.

D. Obtención de bacterias recombinantes que han resuelto el plásmido híbrido insertado en el genoma

D.1. Obtención de la cepa recombinante de App HP816R1, que incorpora el plásmido híbrido pAp<sub>xIA</sub>H2 en el genoma de App como resultado de un único suceso de recombinación homóloga entre dicho plásmido y el genoma de App HP816 Nlr, que es una cepa resistente a ácido nalidíxico obtenida a partir de un mutante espontáneo de la cepa de App HP816.

D.2. Obtención de la cepa AppAp<sub>xIH2</sub><sup>-</sup> mediante un procedimiento que permite, una vez identificadas las bacterias recombinantes obtenidas en el paso D.1., resolver el vector recombinante integrado en el genoma mediante un segundo suceso de recombinación homóloga, así como detectar y aislar las bacterias que, gracias a esta segunda recombinación, hayan adquirido la delección parcial en el gen *apxIA*.

D.3. Obtención de la cepa recombinante de App HP816R2, que incorpora el plásmido híbrido pAp<sub>xIIA</sub>H2 en el genoma de AppAp<sub>xIH2</sub><sup>-</sup> como resultado de un único suceso de recombinación homóloga entre dicho plásmido y el genoma de AppAp<sub>xIH2</sub><sup>-</sup>.

D.4. Obtención de la cepa AppAp<sub>xI/IIH2</sub><sup>-</sup> mediante un procedimiento que permite, una vez identificadas las bacterias recombinantes obtenidas en el paso D.3., resolver el vector recombinante integrado en el genoma mediante un segundo suceso de recombinación homóloga, así como detectar y aislar las bacterias que, gracias a esta segunda recombinación, hayan adquirido la delección parcial en el gen *apxIIA*.

En la presente invención el mutante obtenido AppApxIH2<sup>-</sup> es idéntico a la cepa original salvaje de App excepto por la delección de los nucleótidos 885 a 944 (ambos inclusive) de la secuencia codificante del gen *apxIA*, que se corresponde con la ausencia de los aminoácidos 296 a 315 (ambos inclusive) en la ApxI producida.

5 En la presente invención el mutante obtenido AppApxI/IIH2<sup>-</sup> es idéntico a la cepa AppApxIH2<sup>-</sup> excepto por la delección de los nucleótidos 885 a 944 (ambos inclusive) de la secuencia codificante del gen *apxIIA*, que se corresponde con la ausencia de los aminoácidos 296 a 315 (ambos inclusive) en la ApxII producida.

10 En la realización preferida de la presente invención las únicas modificaciones que se producen en el genoma de App es la delección de 60 bases en el interior de las secuencias codificantes de los genes *apxIA* y *apxIIA* y la sustitución de las mismas por dianas de restricción, en este caso las correspondientes a los enzimas *XhoI* y *EcoRI* respectivamente. No se producen inserciones adicionales de secuencias procedentes del DNA plasmídico (como por ejemplo el gen de resistencia a kanamicina) en el genoma de App. Esto permite que la cepa obtenida pueda ser nuevamente  
15 modificada en el mismo gen u otro gen diana siguiendo exactamente la misma estrategia que se utilizó para producir la primera modificación. Por otra parte, evita que la cepa resultante sea resistente a múltiples antibióticos, característica deseable en una cepa que pretende ser utilizada como vacuna viva.

20 La diana de restricción en particular que se utiliza en la presente invención no es crítica. Aunque podría utilizarse una construcción que no introdujese diana de restricción alguna, es preferible su utilización para disponer de un mecanismo adicional para detectar los clones recombinantes deseados y para poder efectuar un seguimiento de la estabilidad de la cepa o cepas obtenidas. Para ello puede utilizarse  
25 cualquier diana que no introduzca un codón de finalización de la síntesis de proteínas y que dé lugar a fragmentos de restricción analizables por electroforesis (por ejemplo de más de cien pares de bases) con las dianas flanqueantes que puedan existir previamente en el genoma de App.

30 La invención se refiere también a una cepa de App obtenible por el método descrito anteriormente.

Otro objeto de la invención es una cepa de App caracterizada porque tiene una delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIA*, que codifican la segunda transmembrana de la exotoxina ApxI, depositada en la Colección Española de Cultivos



Tipo con el número de registro CECT 5985, según el Tratado de Budapest de 28 de abril de 1977, o un mutante de la misma.

Otro objeto de la invención es una cepa de App caracterizada porque tiene una delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIA* que codifican la segunda transmembrana de la exotoxina ApxI, y además una delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIIA* que codifican la segunda transmembrana de la exotoxina ApxII, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de registro CECT 5994, según el Tratado de Budapest de 28 de abril de 1977, o un mutante de la misma.

La invención también se refiere a las vacunas para la protección de los animales contra la pleuroneumonía porcina. Estas vacunas pueden prepararse según los métodos habituales para el experto.

Estas vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de bacterias de una cepa viva atenuada de App obtenible según el método descrito en la presente invención. Inmunológicamente efectiva significa que la cantidad de bacterias administradas en el proceso de vacunación es suficiente para inducir en el huésped una respuesta inmunológica efectiva frente a una infección por formas virulentas de App.

La dosificación a emplear dependerá de la edad y del peso del animal a vacunar y del modo de administración.

La vacuna puede contener cualquier dosis de bacterias, suficiente para inducir una respuesta inmune. Las dosis adecuadas se encuentran comprendidas en el rango entre  $10^3$  y  $10^{10}$ .

La vacuna puede contener, además, un excipiente farmacéuticamente aceptable. Este excipiente puede ser tan simple como el agua, pero también puede, por ejemplo, comprender el líquido de cultivo en el que se cultivan las bacterias o bien una solución con una concentración fisiológica de sal.

Otros ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención incluyen estabilizantes, hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa, manitol, sorbitol), y tampones (por ejemplo, tampón fosfato).

Opcionalmente se pueden añadir otros compuestos adyuvantes a la vacuna. Estos adyuvantes son estimulantes inespecíficos del sistema inmunológico, que aumentan la respuesta inmunológica del huésped frente al patógeno invasor. Ejemplos de adyuvantes son: vitamina E, aceite vegetal.

Para la administración a los animales, la vacuna puede ser intranasal, intradérmica, subcutánea, mediante aerosol o intramuscular.

La aplicación industrial de la invención se desprende claramente de la descripción. Solamente destacar que la pleuroneumonía porcina es una enfermedad infecciosa respiratoria de distribución mundial responsable de grandes pérdidas económicas en la industria porcina y que el método de la presente invención para  
5 obtener cepas de App inmunógenas no hemolíticas permite la preparación de vacunas eficaces para combatir la pleuroneumonía porcina.

Los ejemplos que siguen a continuación se exponen a efectos de proporcionar al experto en la materia una explicación suficientemente clara y completa de la presente invención, pero no deben ser considerados como limitaciones a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal y como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

## 15 Ejemplo

Las técnicas y métodos de DNA recombinante aplicados a continuación están descritos detalladamente en Sambrook y Russell; *Molecular Cloning* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York (2001) y Ausubel *et al*; *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1998). Todos los  
20 productos de PCR fueron clonados previamente en un plásmido pBE antes de ser digeridos con enzimas de restricción. Este plásmido es un derivado del vector pBluescript SK2 (Stratagene) y presenta el lugar de clonaje múltiple sustituido por una pequeña secuencia nucleotídica que especifica tan sólo la diana del enzima de restricción EcoRV.

25 La cepa de *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene) ha sido utilizada como huésped de los vectores híbridos basados en los plásmidos pUC118 o pBluescript SK. La cepa de *Escherichia coli* S17-1  $\lambda$ pir (Simon *et al*; *Biotechnology* 1:784-791 (1983)) ha sido utilizada como huésped de los vectores híbridos basados en el plásmido pGP704.

30 Todas las secuencias oligonucleotídicas descritas a continuación están escritas en sentido 5' a 3' a menos que se indique explícitamente lo contrario. En todas las reacciones de PCR se utilizó la termopolimerasa Deep Vent (New England Biolabs) que dispone de actividad correctora de pruebas.

### A. Elección de una cepa virulenta de App

La cepa salvaje de App utilizada ha sido la HP816, que corresponde a un aislado natural virulento del serotipo 1 de App de Laboratorios Hipra S.A. (Amer-  
5 Girona-España).

La cepa HP816NI<sup>r</sup> es una cepa resistente a ácido nalidíxico obtenida a partir de un mutante espontáneo de la cepa salvaje HP816.

### B. Identificación de los dominios transmembrana de las exotoxinas ApxI y ApxII

10 Los tres dominios transmembrana, que adoptan una estructura de hélice alfa, fueron determinados mediante el uso de los programas TransMem (Aloy *et al*; Comp.Appl.Biosc. 13:213-234 (1997)) y Helixmem (Eisenbeg *et al*; J.Mol.Biol. 179:125-142 (1984)) tal y como se describe para la *Escherichia coli* en Ludwig *et al*; Mol.Gen.Genet. 226:198-208 (1991), aplicados a la secuencia de aminoácidos de la  
15 ApxI procedente de una cepa de serotipo 1 (Frey *et al*; Gene 142:97-102 (1994)), y la ApxII de una cepa de serotipo 9 (Smits *et al*; Infect.Immun. 59:4497-4504 (1991)). Estos programas detectaron tres regiones que podrían actuar como hélices transmembrana en ambas proteínas (figura 1): la primera transmembrana se sitúa entre los aminoácidos 233 a 253 (H1); la segunda transmembrana entre los aminoácidos 296 a  
20 315 (H2) y la tercera transmembrana entre los aminoácidos 369 a 405 (H3).

### C. Construcción de vectores de clonación híbridos capaces de integrarse en genoma de App

25 En la figura 2 se encuentra un esquema con los mapas de los plásmidos que aparecen en este apartado.

#### C.1.- Obtención del plásmido recombinante pGP3

El plásmido pGP704 (Miller y Mekalanos; J.Bact. 170:2575-2583 (1988)) fue cortado simultáneamente con los enzimas de restricción BgIII y EcoRI.  
30 Mediante electroforesis en gel de agarosa se aisló un fragmento de DNA de 3,7 kb. Este fragmento incubado en una reacción de ligación junto a los oligonucleótidos pGP5' (GAT CGA ATT CAG GAT ATC ACA GAT CT) y pGP3' (AAT TAG ATC TGT GAT ATC GTG AAT TC). El plásmido recombinante obtenido fue denominado pGP1.

El plásmido pGP1 fue digerido con el enzima de restricción *Pst*I. Mediante electroforesis en gel de agarosa se aisló un fragmento de DNA de 3,12 kb. Este fragmento fue ligado a otro de 1,2 kb obtenido mediante la digestión plásmido pUC4K (Pharmacia) con el enzima de restricción *Pst*I. El plásmido recombinante  
5 obtenido fue denominado pGP2.

A partir del plásmido pMAL-p2 (New England Biolabs) se amplificaron mediante PCR las secuencias correspondientes al promotor *ptac* utilizando los oligonucleótidos cebadores *ptac*5' (GAA TTC AAT GCT TCT GGC GTC AG) y *ptac*3' (GGT ACC GGA TGA GAT AAG ATT TTC), que incluyen respectivamente las dianas  
10 de restricción *Eco*RI y *Kpn*I en sus extremos 5'. También a partir del plásmido pMAL-p2 se amplificaron mediante PCR las secuencias correspondientes al terminador rho-independiente del operón *rrnB* utilizando los oligonucleótidos cebadores *rrnB*5' (GGT ACC GGA TGA GAT AAG ATT TTC) y *rrnB*3' (GAA TTC AAG AGT TTG TAG AAA CGC), que incluyen respectivamente las dianas de restricción *Kpn*I y *Eco*RI  
15 en sus extremos 5'. El tamaño del fragmento de DNA amplificado es de 278 pares de bases (pb).

A partir del plásmido pAG408 (Suarez *et al*; Gene 196:69-74 (1997)) se amplificó mediante PCR una fusión del gen de la proteína GFP<sub>UV</sub> con la región de unión al ribosoma del gen *atpE* utilizando los oligonucleótidos cebadores GFP5' (GGT  
20 ACC TAA TTT ACC AAC ACT AC) y GFP3' (GGT ACC TTA TTT GTA GAG CTC ATC), que incluyen la diana de restricción *Kpn*I en sus extremos 5'. El tamaño del fragmento amplificado es de 830 pb.

Los dos primeros fragmentos (promotor *ptac* y terminador *rrnB*) fueron digeridos con los enzimas de restricción *Kpn*I y *Eco*RI mientras que el tercero (fusión  
25 *atpE*-GFP<sub>UV</sub>) fue digerido con el enzima de restricción *Kpn*I. Los tres fragmentos así obtenidos fueron ligados entonces con el plásmido pGP2 previamente cortado con el enzima de restricción *Eco*RI y defosforilado. De entre los diferentes plásmidos recombinantes obtenidos se seleccionó uno que era portador de los tres fragmentos orientados según se muestra en la figura 2. Las colonias portadoras de este plásmido  
30 mostraban una intensa fluorescencia al ser iluminadas con luz ultravioleta. El plásmido híbrido obtenido fue denominado pGP3.

## C.2.- Construcción del plásmido híbrido pAp<sub>x</sub>IAH2

El primer objetivo de este paso era obtener un fragmento de DNA contiguo al extremo 5' del segmento codificante de la segunda hélice transmembrana del gen *apxIA*. Para ello se amplificó mediante PCR un fragmento de 897 pb a partir de DNA genómico purificado de la cepa de App HP816 utilizando como cebadores los oligonucleótidos ApxIa5' (GAT ATC ATG GCT AAC TCT CTC AGC TCG ATA G) y ApxIa3' (CTC GAG GCC TGC CGC CAC ACG TTG), que incluyen las dianas de restricción *EcoRV* y *XhoI* en sus extremos 5' respectivos. La base número 7 del oligonucleótido ApxIa5' se corresponde con la primera base del codón de inicio de traducción del gen *ApxIa*. La séptima base del oligonucleótido ApxIa3' es complementaria a la base 885 de la secuencia codificante del gen *apxIA*, siendo ésta la última base antes del inicio de la secuencia para la segunda hélice transmembrana.

El segundo objetivo de este paso era obtener un fragmento de DNA contiguo al extremo 3' del segmento codificante de la segunda hélice transmembrana del gen *apxIA*. Para ello se amplificó mediante PCR un fragmento de 1042 pb a partir de DNA genómico purificado de la cepa de App HP816 utilizando como cebadores los oligonucleótidos ApxIb5' (CTC GAG CCG CTT TCG TTC TTA AAT GTT GCG) y ApxIb3' (AGA TCT TCA CCG GCT TTC TGT GCA CTT TG), que incluyen las dianas de restricción *XhoI* y *BglII* en sus extremos 5' respectivos. La base número 7 del oligonucleótido ApxIb5' se corresponde con la base 944 de la secuencia codificante del gen *apxIA*, siendo ésta la primera base después del final de la secuencia para la segunda hélice transmembrana. La séptima base del oligonucleótido ApxIb3' es complementaria a la base 1975 de la secuencia codificante del gen *apxIA*.

Una vez obtenidos los dos fragmentos descritos anteriormente, el primero fue digerido con los enzimas de restricción *EcoRV* y *XhoI*, mientras que el segundo fue digerido con los enzimas *XhoI* y *BglII*. Ambos fragmentos fueron entonces ligados con el vector pGP3 previamente cortado con los enzimas de restricción *EcoRV* y *BglII*. El plásmido híbrido resultante recibió el nombre de pApxIIΔH2.

### C.3.- Construcción del plásmido híbrido pApxIIΔH2

El primer objetivo de este paso era obtener un fragmento de DNA contiguo al extremo 5' del segmento codificante de la segunda hélice transmembrana del gen *apxIIA*. Para ello se amplificó mediante PCR un fragmento de 871 bp a partir de DNA genómico purificado de la cepa de App HP816 utilizando como cebadores los

oligonucleótidos ApxIIa5' (GAT ATC AAA TCG TCC TTA CAA CAA GGA TTG) y ApxIIa3' (GAA TTC ACC TGA AGC GAC TCG TTG GGC), que incluyen las dianas de restricción *EcoRV* y *EcoRI* en sus extremos 5' respectivos. La base número 7 del oligonucleótido ApxIIa5' se corresponde con la base 27 de la secuencia codificante del gen *apxIIA*. La séptima base del oligonucleótido ApxIIa3' es complementaria a la base 885 de la secuencia codificante del gen *apxIIA*, siendo ésta la última base antes del inicio de la secuencia para la segunda hélice transmembrana.

El segundo objetivo de este paso era obtener un fragmento de DNA contiguo al extremo 3' del segmento codificante de la segunda hélice transmembrana del gen *apxIIA*. Para ello se amplificó mediante PCR un fragmento de 952 pb a partir de DNA genómico purificado de la cepa de App HP816 utilizando como cebadores los oligonucleótidos ApxIIb5' (GAA TTC CCT CTT TCA TTC TTA AAT GTA GC) y ApxIIb3' (AGA TCT GCC ATC AAT AAC GGT AGT ACT TG), que incluyen las dianas de restricción *EcoRI* y *BglII* en sus extremos 5' respectivos. La base número 7 del oligonucleótido ApxIIb5' se corresponde con la base 944 de la secuencia codificante del gen *apxIIA*, siendo ésta la primera base después del final de la secuencia para la segunda hélice transmembrana. La séptima base del oligonucleótido ApxIIb3' es complementaria a la base 1845 de la secuencia codificante del gen *apxIIA*.

Una vez obtenidos los dos fragmentos descritos anteriormente, el primero fue digerido con los enzimas de restricción *EcoRV* y *EcoRI*, mientras que el segundo fue digerido con los enzimas *EcoRI* y *BglII*. Ambos fragmentos fueron entonces ligados con el vector pGP3 previamente digerido con los enzimas de restricción *EcoRV* y *BglII*. El plásmido híbrido resultante recibió el nombre de pApxIIΔH2.

## 25 D.- Obtención de bacterias recombinantes que han resuelto el plásmido híbrido insertado en el genoma

### D.1. Obtención de la cepa recombinante de App HP816R1

La transformación de App con el plásmido híbrido pApxIIΔH2 se realizó por conjugación a partir de células de *Escherichia coli* S17-1 λpir portadoras de este plásmido. La cepa empleada para la transformación con el plásmido híbrido pApxIIΔH2 fue la HP816NI<sup>r</sup>.

Antes de proceder a la conjugación se obtuvo un cultivo en fase estacionaria para dichas bacterias. El medio de cultivo empleado para App 816 NI<sup>r</sup> fue

TSYN (Caldo de soja triptica 30 g/L, extracto de levadura 6 g/L y una vez autoclavado suplementado con NAD al 0,004%) y ácido nalidíxico 50 µg/mL. El medio de cultivo empleado para *Escherichia coli* S17-1 λpir fue LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) que una vez autoclavado fue suplementado con kanamicina 25 µg/mL. Una vez alcanzada la fase estacionaria, se añadieron 0,2-0,3 unidades de A<sub>600</sub> del cultivo de App y 0,6-0,8 unidades de A<sub>600</sub> del cultivo de *E. coli* a 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. A continuación se centrifugó durante 2 minutos a 15.000 g y el sedimento fue resuspendido en 200 µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Una vez obtenida la mezcla de ambos cultivos, esta se extendió sobre un filtro de nitrocelulosa de 2,5 cm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro previamente depositado sobre una placa de Petri con medio TSYN suplementado con agar noble 15 g/L. Después de incubar durante 6 horas a 37°C el filtro con la conjugación se depositó en un tubo con 2 mL de PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, NaCl 137 mM, KCl 2mM pH 7,4). Después de agitar vigorosamente, se retiró el filtro y la suspensión celular se centrifugó durante 2 minutos a 15.000 g y el sedimento fue resuspendido en 500 µl de PBS. La suspensión así obtenida se distribuyó en placas de Petri con medio TSYN suplementado con agar noble 15 g/L, kanamicina 50 µg/mL y ácido nalidíxico 50 µg/mL, a razón de 100 µL de suspensión celular por placa de Petri. Los cultivos resultantes se incubaron a 37°C durante 24-36 horas. Con este procedimiento se obtuvieron un total de 65 colonias resistentes a kanamicina y ácido nalidíxico para la conjugación con el plásmido pApXIΔH2, que equivale a una frecuencia de transformación de  $1,3 \times 10^{-7}$  por célula receptora.

Varias colonias fueron resembradas por agotamiento de asa en placas de Petri con LB suplementado con agar noble 15 g/L. NAD 0,004 %, kanamicina 50 µg/mL y ácido nalidíxico 50 µg/mL. Todas las colonias resultantes exhibían un mayor o menor grado de fluorescencia cuando eran iluminadas con luz ultravioleta, indicación de la integración del plásmido en el genoma de App en un único suceso de recombinación. Como puede observarse en la figura 3, en el caso de producirse una doble recombinación, los exconjugantes serán incapaces de crecer en un medio con kanamicina. La presencia de este antibiótico en las placas permite por lo tanto el crecimiento sólo de aquellos recombinantes que han integrado la totalidad del plásmido en su genoma. El gen indicador GFP permite discriminar si alguna de las colonias resistentes a kanamicina es el producto de una mutación espontánea.

Finalmente, los recombinantes obtenidos se originaron a partir de una recombinación homóloga entre un plásmido y el gen *apxIA*. Esto se comprobó observando la actividad hemolítica de los recombinantes en placas de agar sangre Columbia suplementadas con NAD al 0,004% (figura 3, panel C). Los recombinantes  
 5 obtenidos con el plásmido pAp $\chi$ IAH2 exhiben una drástica disminución del diámetro del halo hemolítico respecto la cepa paterna HP816N<sup>r</sup>.

Uno de los recombinantes obtenidos con el plásmido pAp $\chi$ IAH2 fue seleccionado para los pasos posteriores y nombrado HP816R1.

## 10 D.2. Obtención de la cepa AppAp $\chi$ IH2<sup>-</sup>

Una vez obtenidos los recombinantes con el plásmido pAp $\chi$ IAH2 integrado en el genoma es preciso fijar la delección en el genoma de App mediante una segunda recombinación. Para ello uno de los recombinantes del paso anterior fue sometido a pases seriados en medio de cultivo suplementado sólo con ácido nalidíxico.  
 15 Un medio sin kanamicina permite que, en el caso de producirse una segunda recombinación entre el genoma de App y el plásmido integrado, las bacterias resultantes sean viables. Este segundo suceso de recombinación da lugar a la aparición de dos genotipos diferentes. En el caso que se produzca por el mismo segmento en el que ya tuvo lugar la primera recombinación, el genotipo resultante será idéntico al de la cepa  
 20 paterna usada en el apartado D.1. En el caso que esta segunda recombinación tenga lugar por el segmento en el que no tuvo lugar la primera recombinación, el genotipo resultante presentará la delección en el fragmento que codifica para la segunda hélice transmembrana de la hemolisina (figuras 3, panel A). La aparición de recombinantes puede monitorizarse de varias maneras diferentes: a) desaparición de la fluorescencia al  
 25 iluminar las colonias con luz ultravioleta; b) sensibilidad a la kanamicina y c) recuperación del halo hemolítico que exhibía la cepa paterna usada en el apartado D.1. Los métodos a) y b) detectan los dos tipos de recombinantes. El método c) permite distinguir sólo los recombinantes que recuperan el genotipo paterno. Esto es debido a que en los recombinantes que presentan la delección en el segmento codificante de la  
 30 segunda hélice transmembrana del gen *apxIA* no se restaura la actividad hemolítica del correspondiente fenotipo paterno.

Los pases seriados fueron realizados a partir de diluciones 1/10000 del pase anterior, con la excepción del primer pase que consistió simplemente en un cultivo



realizado a partir de una colonia aislada de HP816R1. El medio de cultivo fue LB suplementado con NAD 0,004 % y ácido nalidíxico 50 µg/mL. Para cada pase se empleó un volumen total de 10 ml de medio. En la Tabla 1 están expuestos los porcentajes de recombinantes detectados a partir del segundo pase:

Tabla 1

Nº de pase	% de recombinantes detectados (a)	% de recombinantes detectados (b)
2	0,12%	0,18%
3	0,32%	0,46%
4	7,75%	10,4%
5	18,5%	22,3%

- a) porcentaje determinado mediante el recuento de colonias que recuperaron el halo hemolítico que exhibía la cepa paterna.
- b) porcentaje determinado mediante el recuento de colonias que no exhibían fluorescencia al ser iluminadas con luz ultravioleta.

Como puede observarse en la tabla anterior, en cada pase va aumentando el número de bacterias que presentan el plásmido resuelto debido a una segunda recombinación. El porcentaje de colonias no fluorescentes es sólo ligeramente más alto que el de las colonias que recuperan la actividad hemolítica. Este hecho sugiere que la segunda recombinación se produce preferentemente en el mismo segmento de DNA por el que tuvo lugar la primera recombinación. Si la frecuencia para cada tipo de recombinante fuera del 50% debería observarse el doble de colonias no fluorescentes respecto a las que recuperan la actividad hemolítica.

Una vez el cultivo está suficientemente enriquecido en segundos recombinantes puede procederse a su purificación. Para ello se replicaron varias colonias no fluorescentes sobre agar Columbia suplementado con NAD y LB agar suplementado con NAD, ácido nalidíxico 50 µg/mL y kanamicina 20µg/mL (LBNKm). Se seleccionaron para estudios posteriores varias colonias que no mostraron crecimiento sobre LBNKm y que presentaban la misma actividad hemolítica que el recombinante por inserción, HP816R1.

### D.3. Obtención de la cepa recombinante de App HP816R2

La transformación de App con el plásmido híbrido pAp $\alpha$ IIAH2 se realizó mediante conjugación a partir de células de *Escherichia coli* S17-1  $\lambda$ pir portadoras de estos plásmidos. La cepa empleada para la transformación con el plásmido híbrido pAp $\alpha$ IIAH2 fue la AppAp $\alpha$ IH2<sup>-</sup>. El procedimiento y los medios de cultivo son idénticos a los descritos en el apartado D.1. La frecuencia de transformación con el plásmido pAp $\alpha$ IIAH2 era similar al obtenido en el apartado D.1. para el plásmido pAp $\alpha$ IH2.

Varias colonias fueron resemebradas por agotamiento de asa en placas de Petri con LB suplementado con agar noble 15 g/L. NAD 0,004 %, kanamicina 50  $\mu$ g/mL y ácido nalidíxico 50  $\mu$ g/mL. Todas las colonias resultantes exhibían un mayor o menor grado de fluorescencia cuando eran iluminadas con luz ultravioleta, indicación de la integración del plásmido en el genoma de App en un único suceso de recombinación. Como puede observarse en la figura 4, en el caso de producirse una doble recombinación, los exconjugantes serán incapaces de crecer en un medio con kanamicina. La presencia de este antibiótico en las placas permite por lo tanto el crecimiento sólo de aquellos recombinantes que han integrado la totalidad del plásmido en su genoma. El gen indicador GFP permite discriminar si alguna de las colonias resistentes a kanamicina es el producto de una mutación espontánea.

Finalmente, los recombinantes obtenidos se originaron a partir de una recombinación homóloga entre el plásmido y el gen respectivo *apxIIA*. Esto se comprobó observando la actividad hemolítica de los recombinantes en placas de agar sangre Columbia suplementadas con NAD al 0,004% (figura 4, panel C). Los recombinantes obtenidos con el plásmido pAp $\alpha$ IIAH2 muestran una desaparición completa del halo hemolítico.

Uno de los recombinantes obtenidos con el plásmido pAp $\alpha$ IIAH2 fue seleccionado para los pasos posteriores y nombrado HP816R2.

#### D.4. Obtención de la cepa AppAp $\alpha$ I/H2<sup>-</sup>

Una vez obtenidos los recombinantes con el plásmido pAp $\alpha$ IIAH2 integrado en el genoma es preciso fijar la delección en el genoma de App mediante una segunda recombinación. Para ello los recombinantes del paso anterior fueron sometidos a pases seriados en medio de cultivo suplementado sólo con ácido nalidíxico tal y como

se ha descrito en D.2. Los valores de los porcentajes de recombinantes detectados a partir del segundo pase son similares a los obtenidos en D.2.

Una vez el cultivo está suficientemente enriquecido en segundos recombinantes puede procederse a su purificación. Para ello se replicaron varias colonias no fluorescentes sobre agar Columbia suplementado con NAD y LB agar suplementado con NAD, ácido nalidíxico 50 µg/mL y kanamicina 20µg/mL (LBNKm). Se seleccionaron para estudios posteriores varias colonias que no mostraron crecimiento sobre LBNKm y que presentaban la misma actividad hemolítica que el recombinante por inserción, HP816R2.

10

E.- Análisis del DNA purificado a partir de las colonias aisladas en el paso anterior con objeto de comprobar la homogeneidad de los cultivos y la presencia de la delección en los genes *apxIA* y *apxIIA*

Los recombinantes de los pasos D.2. y D.4. anteriores fueron cultivados en 10 mL de medio TSYN suplementado con ácido nalidíxico 50 µg/mL hasta fase estacionaria, realizándose posteriormente una extracción de DNA de cada uno de ellos.

#### E.1.- Análisis de los recombinantes *apxIH2*<sup>-</sup>

Las muestras de DNA genómico correspondientes a cada uno de los cultivos de los segundos recombinantes obtenidos a partir del plásmido pAp<sub>xI</sub>ΔH<sub>2</sub> fueron digeridas con el enzima de restricción *Xho*I. Estas digestiones, junto a otras realizada a partir del DNA extraído de los cultivos de la cepa HP816NI<sup>r</sup> y HPB816R1 respectivamente, se analizaron mediante Southern-blot utilizando como sonda el fragmento de DNA de 1927 pb procedente de la digestión del plásmido pΔAp<sub>xI</sub>H<sub>2</sub><sup>-</sup> con los enzimas de restricción *Eco*RV y *Bgl*II. En la figura 3B se muestra el resultado de estas hibridaciones. Los resultados de la hibridación de la cepa control HP816NI<sup>r</sup> establecen la presencia de una diana de restricción *Xho*I situada a aproximadamente 20 kb de la que se encuentra en el interior del operón *apxI*. El análisis del recombinante con la inserción del plásmido pAp<sub>xI</sub>ΔH<sub>2</sub> muestra la aparición de dos nuevas bandas de 1,1 y 4,3 kb y un ligero incremento de aproximadamente 1 kb de la banda preexistente de 20 kb. El tamaño de las nuevas bandas y el incremento de la preexistente son los esperados a partir de la inserción del plásmido híbrido pAp<sub>xI</sub>ΔH<sub>2</sub> en la región flanqueante 5' del segmento codificante de la segunda hélice transmembrana del gen *apxIA* del genoma de App (Figura 3A, esquema 2). El análisis del recombinante con el

plásmido resuelto a partir de una segunda recombinación por la misma región 5' por donde tuvo lugar la primera, muestra la desaparición de las dos bandas de menor masa molecular y una ligera disminución de la movilidad de la banda de 21 kb anterior hasta equipararla a la de la cepa paterna. Esto, junto con el hecho de que la actividad hemolítica es idéntica a la que exhibe la cepa paterna HP816NI<sup>r</sup> sugiere que no se introducen modificaciones adicionales en el genoma de App durante todo este proceso (Figura 3, A y C).

Finalmente, el análisis del recombinante con el plásmido resuelto a partir de una segunda recombinación por la región flanqueante 3' del segmento que codifica la segunda hélice transmembrana muestra la desaparición de la banda de 4,3 kb, la conservación de la banda de 1,1 kb que ya se observaba en el recombinante por inserción y una ligera disminución de la banda de 20 kb. Esta distribución de bandas es la esperada a partir de la desaparición del segmento codificante de la segunda hélice transmembrana y su sustitución por una diana *Xho*I. Esta nueva diana insertada en el genoma de App origina el fragmento observado de 1,1 kb i la disminución consiguiente de 1,1 kb en la banda de 20 kb que se observa en la cepa 816 NI<sup>r</sup> (Figura 3A y B). Obsérvese en CA la presencia de grandes halos hemolíticos alrededor de las colonias de los cultivos 1 y 3 y de halos hemolíticos pequeños alrededor de las colonias en los cultivos 2, 4 y 5. Nótese también la ausencia de crecimiento en TS de los cultivos 1, 3, 4 y 5. Este recombinante muestra una actividad hemolítica muy reducida en comparación a la cepa paterna HP816 NI<sup>r</sup> y la misma actividad hemolítica que una cepa de serotipo 7 de App que sólo dispone de hemolisina ApxII (Figura 3C). Este resultado indica que la delección en la segunda hélice transmembrana elimina o reduce considerablemente, la actividad hemolítica de la ApxIA de App. La ApxIA modificada mediante la delección descrita será nombrada a partir de ahora como ApxIAH2<sup>-</sup>.

La cepa recombinante así obtenida, caracterizada por tener una delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIA* que codifican el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxI, ha sido designada AppApxIH2<sup>-</sup>. Con fecha de 10 de Enero de 2002 y de acuerdo con las condiciones del tratado de Budapest, se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de registro CECT 5985.

## E.2.- Análisis de los recombinantes *apxI*/IH2<sup>-</sup>

Las muestras de DNA genómico correspondientes al recombinante por inserción HP816R2 y a los segundos recombinantes obtenidos a partir del plásmido pApxIIAH2<sup>-</sup> fueron digeridas con el enzima de restricción *EcoRI*. Estas digestiones, junto a otra realizada a partir del DNA extraído de un cultivo de la cepa HP816N<sup>I</sup>, se analizaron mediante Southern-blot. Como sonda se utilizaron los dos fragmentos de DNA amplificados mediante PCR que corresponden a las regiones flanqueantes 5' y 3' del segmento de DNA que codifica para la segunda hélice transmembrana de la ApxII (apartado B). En la figura 4B se muestra el resultado de estas hibridaciones. Los resultados de la hibridación de la cepa control HP816 N<sup>I</sup> establecen la presencia de dos

10 dianas de restricción *EcoRI* separadas por 15,7 kb que delimitan un fragmento en el que se encuentra incluido el operón *apxII*. El análisis del recombinante por inserción del plásmido pApxIIAH2 muestra la desaparición de la banda de 15,7 kb y la aparición de tres nuevas bandas de 8,2, 7,5 y 0,9 kb. El tamaño de las nuevas bandas son el esperado a partir de la inserción del plásmido híbrido pApxIIAH2 en la región flanqueante 3' del

15 segmento codificante de la segunda hélice transmembrana del gen *apxIIA* del genoma de App (Figura 4A). El análisis del recombinante con el plásmido resuelto a partir de una segunda recombinación por la misma región 3' por donde tuvo lugar la primera, muestra la reaparición de una única banda de 15,7 kb que coincide con la mostrada por la cepa control (Figura 4B). La actividad hemolítica es idéntica a la que exhibe la cepa

20 paterna AppApxIIH2<sup>-</sup> (Figura 4C). Finalmente, el análisis del recombinante con el plásmido resuelto a partir de una segunda recombinación por la región flanqueante 3' del segmento que codifica la segunda hélice transmembrana muestra la desaparición de las bandas de 13,5 y 0,9 kb y la aparición de un nuevo fragmento de 7,5 kb (Figura 4B). Esta distribución de bandas es la esperada a partir de la desaparición del segmento

25 codificante de la segunda hélice transmembrana y su sustitución por una diana *EcoRI* (Figura 4A). Esta nueva diana insertada en el genoma de App hace que el fragmento de 15,7 kb *EcoRI* que incluía al operón *apxII* en la cepa paterna se desdoble en dos fragmentos de 8,2 y 7,5 kb (Figura 4A y B). Este recombinante es virtualmente no hemolítico (Figura 4C). Este resultado indica que la delección en la segunda hélice

30 transmembrana elimina, o reduce en su práctica totalidad, la actividad hemolítica de la ApxIIA de App. La ApxIIA modificada mediante la delección descrita será nombrada a partir de ahora como ApxIIAH2<sup>-</sup>. Obsérvese en CA la presencia de pequeños halos hemolíticos alrededor de las colonias de los cultivos 1 y 3 y la ausencia de halos

hemolíticos alrededor de las colonias en los cultivos 2 y 4. Nótese también la ausencia de crecimiento en TS de los cultivos 1, 3 y 4.

La cepa recombinante así obtenida, caracterizada por tener una delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIA* que codifican el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxI y, además una delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIIA* que codifican el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxII, ha sido designada AppApxI/IIH2<sup>-</sup>. Con fecha de 12 de Junio de 2002 y de acuerdo con las condiciones del tratado de Budapest, se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de registro CECT 5994.

**F.- Análisis de la producción de las ApxIAH2<sup>-</sup> y ApxIIAH2<sup>-</sup> por parte de las cepas recombinantes obtenidas**

Para determinar si las cepas recombinantes obtenidas segúan produciendo las Apx H2<sup>-</sup>, se estudió la acumulación de las mismas en cultivo líquido con medio LB. Las Apx producidas fueron detectadas mediante anticuerpos monoclonales específicos para la ApxI y la ApxII mediante técnicas de inmunoensayo y Western blot. Tal como se muestra en la figura 5 (A y B), la producción y excreción al medio de las ApxIAH2<sup>-</sup> y ApxIIAH2<sup>-</sup> por parte de las cepas recombinantes sigue el mismo patrón temporal que las Apx no modificadas de la cepa salvaje paterna HP816N<sup>f</sup>. Todas las hemolisinas (modificadas o no) aparecen en el medio de cultivo hacia la segunda mitad de la fase de crecimiento exponencial y alcanzan la máxima acumulación al principio de la fase estacionaria. A partir de este momento la concentración de todas las hemolisinas se mantiene estable o decae ligeramente. Tal como puede observarse en la misma figura, las ApxIAH2<sup>-</sup> y ApxIIAH2<sup>-</sup> se acumulan hasta alcanzar niveles similares a los que muestran las respectivas Apx no modificadas producidas por la cepa salvaje paterna HP816 N<sup>f</sup>. Por otra parte, la delección introducida es muy pequeña (18 aminoácidos) y sólo se espera una disminución de 2 kDa en la masa molecular de las dos ApxH2<sup>-</sup>. Dado que las dos hemolisinas salvajes tienen una masa molecular aparente aproximada de 105 kDa, una disminución de 2 kDa en su masa molecular es inapreciable en los geles de poliacrilamida y sus correspondientes Western-blot (Figura 6). Finalmente también hay que destacar que en esta misma figura no aparecen, de manera significativa, productos polipeptídicos truncados o mal procesados. Obsérvese que la banda de 105 kDa del carril 3 aparece detectada sólo en

(C). Todos estos datos indican que la pequeña delección introducida en ambas Apx no impide que éstas sean sintetizadas de manera completa y exportadas hasta el medio de cultivo. Una vez liberadas al medio de cultivo, las ApxH2<sup>-</sup> exhiben una estabilidad similar a la mostrada por las respectivas Apx no modificadas.

5

#### G.- Efectividad de la atenuación las cepas obtenidas

Para ensayar el nivel de atenuación de las dos cepas recombinantes obtenidas se emplearon cerdos híbridos LWxLD de tres meses de edad y sin distinción de sexo. Se establecieron cuatro grupos de animales para los diferentes ensayos. El método para inocular cada una de las diferentes cepas fue una inyección intratraqueal de un total de 10<sup>8</sup> cfus en 5 mL de PBS a cada uno de los animales de los tres primeros grupos. Previamente se determinó esta dosis como la dosis letal 50 para la cepa salvaje HP816N<sup>r</sup> en cerdos de esta edad. Los animales del cuarto grupo recibieron tan sólo una inyección de 5 mL de PBS. Durante los siete días de realización de la prueba se anotaron diariamente los signos clínicos de los animales. La Tabla 2 muestra los resultados:

15

Tabla 2

Cepa	Nº de animales	Dosis App (cfu)	Mortalidad	Días con alteraciones del comportamiento (a)			Días con síntomas respiratorios clínicos (b)		
				0-2	3-4	5-6	0-2	3-4	5-6
HP816N <sup>r</sup>	5	10 <sup>8</sup>	2/5	5/5	3/3	3/3	5/5	1/3	0/3
AppApxIH2 <sup>-</sup>	10	10 <sup>8</sup>	0	10/10	9/10	4/10	5/10	3/10	3/10
AppApxI/IIIH2 <sup>-</sup>	10	10 <sup>8</sup>	0	4/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10
Control (PBS)	5	N.A.	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

(a) Animales con una disminución de la capacidad de respuesta y de alerta en presencia de un observador (afectados/total)

20

(b) Animales con alteraciones del ritmo respiratorio y/o disnea (afectados/total)

Siete días después de la inoculación se practicó la eutanasia a los animales y se valoraron las lesiones macroscópicas observadas en los órganos respiratorios. También se realizaron aislamientos bacteriológicos a partir de las necropsias.

25

Los resultados obtenidos en este ensayo se encuentran resumidos en la

Tabla 3.

Los animales inoculados la cepa salvaje exhibieron alteraciones del comportamiento durante los siete días de la prueba y presentaron síntomas respiratorios clínicos graves durante las primeras 48 horas después de la inoculación.

5

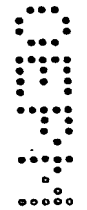
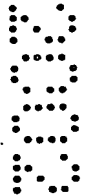
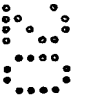
Tabla 3

Cepa	Nº de animales	Dosis App	Mortalidad	Animales con lesiones pulmonares	Índice medio de las lesiones pulmonares	Animales en los que se aisló App
HP816Nlr	5	$10^8$ cfus	2/5	4	$11,6 \pm 12,1$	3
AppApXI $H_2^-$	10	$10^8$ cfus	0	7	$3,2 \pm 4,6$	3
AppApXI/II $H_2^-$	10	$10^8$ cfus	0	0	0	8
Control (PBS)	5	N.A.	0	0	0	0

Dos de los cinco animales de este grupo murieron durante este período de tiempo. Las necropsias de los animales de este grupo mostraron lesiones pulmonares graves en cuatro de los cinco animales. Los animales del grupo inoculado con la cepa AppApXI $H_2^-$  también mostraron alteraciones del comportamiento aunque fueron remitiendo a partir de los cuatro días de la inoculación. Los síntomas clínicos fueron más leves y se presentaron sólo en el 50% de los animales. Aunque ningún animal de este grupo murió durante el transcurso de la prueba, en las necropsias se apreciaron lesiones en un 70% de los casos, aunque todas ellas eran de carácter más leve que las del grupo anterior. El tercer grupo fue inoculado con la cepa AppApXI/II $H_2^-$ . Aunque cuatro de los animales mostraron alteraciones leves del comportamiento, éstas remitieron a partir de las 48 horas post-inoculación. Los dos animales que mostraron algún síntoma clínico leve también se recuperaron durante las primeras 48 horas. En las necropsias no se apreciaron lesiones pulmonares en ninguno de los diez animales. La valoración de las lesiones pulmonares se realizó según Hannan *et al*; Research in Veterinary Science 33:76-88 (1982). Los valores que se muestran son las medias aritméticas de cada grupo acompañadas de su correspondiente desviación típica. Según estos resultados, la cepa AppApXI/II $H_2^-$  es avirulenta y puede ser usada de forma segura como vacuna viva. Es importante destacar que en el 80% de los animales de este grupo se logró aislar la cepa inoculada siete días después de su administración. Este resultado indica que la viabilidad de la cepa AppApXI/II $H_2^-$  en una infección experimental no se



ve alterada por el hecho de no disponer de actividad hemolítica. Este dato es importante si tenemos en cuenta que es esencial que el microorganismo se mantenga viable para que puedan producirse y liberarse las exotoxinas Apx. Sin la producción de las exotoxinas Apx la cepa atenuada no podría emplearse como vacuna viva ya que sería incapaz de inducir una respuesta inmunitaria que protegiera al animal frente a futuras infecciones (Reimer *et al*; Microbial Pathogenesis 18:197-209 (1995)). En todos los ensayos se ha obtenido una respuesta inmunógena elevada.



## REIVINDICACIONES

- 5           1.- Un método para obtener una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* inmunógena y no hemolítica, a partir de una cepa virulenta de App, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- se determinan los dominios transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas
  - 10       - se modifica al menos un segmento del gen *apxIA* y eventualmente un segmento del gen *apxIIA*, que codifican un dominio transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas.
- 15           2.- Un método según la reivindicación 1 caracterizado porque introduce una delección en al menos un segmento del gen *apxIA* y eventualmente en un segmento del gen *apxIIA*, que codifican un dominio transmembrana de las exotoxinas Apx hemolíticas y citolíticas.
- 20           3.- Un método según la reivindicación 2 caracterizado porque introduce una delección en el segmento del gen *apxIA*, que codifica el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxI de App.
- 25           4.- Un método según la reivindicación 3 caracterizado porque introduce una delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIA*, que codifican el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxI de App.
- 30           5.- Un método según la reivindicación 4 caracterizado porque introduce además una delección en el segmento del gen *apxIIA*, que codifica el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxII de App.
- 6.- Un método según la reivindicación 5 caracterizado porque introduce una delección de los nucleótidos 885 a 944 del gen *apxIIA*, que codifican el segundo dominio transmembrana de la exotoxina ApxII de App.

7.- Una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

5

8.- Una vacuna contra la pleuroneumonía porcina caracterizada porque comprende una cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10

9.- La cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* inmunógena y no hemolítica depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de registro CECT 5985 o un mutante de la misma.



15

10.- Una vacuna contra la pleuroneumonía porcina caracterizada porque comprende la cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* según la reivindicación 9.



11.- La cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* inmunógena y no hemolítica depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de registro CECT 5994 o un mutante de la misma.



20

12.- Una vacuna contra la pleuroneumonía porcina caracterizada porque comprende la cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* según la reivindicación 11.



25

30

ApXIA	MANSQLDVRVGLIDSLNQHTKSAAKSGAGALKNGLGQV---- <td>56</td>	56
ApXIIA	MSKITLSSLKSSLQOGLKNGKNKLNOAGTTLKNGLTQTGHSLQNGAKKLILYIPQGYDSG	60
	*:: * . : * . : : . : : * . : . . : * * * * * : : : : * * * * * : : * : .	
ApXIA	TGSSSLNDLVKAAEALGIEVHRSEKNGTALAKELFGTTEKLLGFSERGIALFAPQFDKLLN	116
ApXIIA	QGNQVQDLVKAANDLGIEVWREERSNLDIAKTSFDTTQKILGFTDRGIVLFAPQOLDNLLK	120
	* . . : : * * * * * : * * * * * * . : . . : * * * . : * : * : : * * * : : * : * : :	
ApXIA	KNQKLSKSLGGSSEALGQRLNKTQTALSALQSFLGTAIAGMDLDSLLRRRRRNGEDVSGSE	176
ApXIIA	KNPKIGNTLG-SASSISQNIQKANTVLGGIQSILGSVLSGVNLNELLQNK----DPNQLE	175
	** * . : : : * * * . : : . . . : . . . : * : * : : : : : : : : * . . . *	
ApXIA	LAKAGVDLAAQLVDNIASATGTVDFAEQLGKLAMPYLTLA-LSGLASKLNNLPDLQLAG	235
ApXIIA	LAKAGLELTNELVGNIASSVQTVDAFAEQISKLGSHLQNVKGLGGLSNKLQNLQDLQKAS	235
	***** : * : : * * . * * * : . * * * * * : * * . : . : * . * : : * : * * * * * : *	
	H1	
ApXIA	PGFDAVSGILSVVSASFELSNKDADAGTKAAAGIEISTKILGNIGKAVSQYIIAQRVAAG	295
ApXIIA	LGLDIISGLLSGASAGLILAI XEASTEKKAAAGVEFANQIIGNVTKAVSSYILAQRVASG	295
	* : * : * : * * * . * * : * : : * : : : . * * * * : * : : : * : * : * * * : * *	
	H2	
ApXIA	LSSTTAATGGLJGSVVALAISPLSFLNVADKFERAKQLEQYLSERFCKFGYEGDSLLACFYR	355
ApXIIA	LSSTGFVAALIASTVALAVSPLSFLNVADKFKQADLIKSYSERFQKLGVDGDRLLADFHR	355
	* * : * . . . . * * * . * * * * : * * * * * * * : * . : . * * * * : * : * : * * * * * * *	
	H3	
ApXIA	ETGAIEAALTITINSVLSARSAGVGAAATGSLVGAPVAALVSAITGIISGIIDASKQAI FE	415
ApXIIA	ETGTIDASVTTINFALAAISGGVGAASAGSLVGAPVALLVAGVTGLITTIIEYSKQAMFE	415
	*** : * : * : * * * : * : * * * * * : * * * * * * * * : * : * : * : * : * * * : * *	
ApXIA	RVATKLANKIDEWKXKHGKNYFENGYDARHSAPLEDTFELLSQYNKEYSVERVVAITQOR	475
ApXIIA	HVANKVHDRVWEKKHKNYFEQGYDSRHLADLQDNMKFLINLNKELQAERVVAITQOR	475
	: * * . * : : : * * * * * . * * * * : * * * : * * * * : : * : * * * . * * * * * * *	
ApXIA	WDVNIGELAGITRKGS DTKSGKAYVDFFEEGKLLKEPDRFDKKVFDPLEGKIDLSSIN-	534
ApXIIA	WDNQIGDLAAISRRTDKISSGKAYVDAFEEGQHQS YDSS----VQLDNKNGIINISNTNR	531
	** : * * : * * . * : . . * * * * * * * * : . : . . : * : * * * : * . *	
ApXIA	KTLLKFVTPVFTAGEEIRERKQTKGYQYMTFLVKGKEKWVVTGVQSHNAIYDYTNLIQ	594
ApXIIA	KTQSVLFRTPLLTPGEENRRIQEGKNSYITKLHIQRVDSWTVTGDGAS-SSVDFTNVVQ	590
	** : * * * : * . * * * * * * * * . * : * : * : : . : * * * . : : : * : * * : * *	

Figura 1

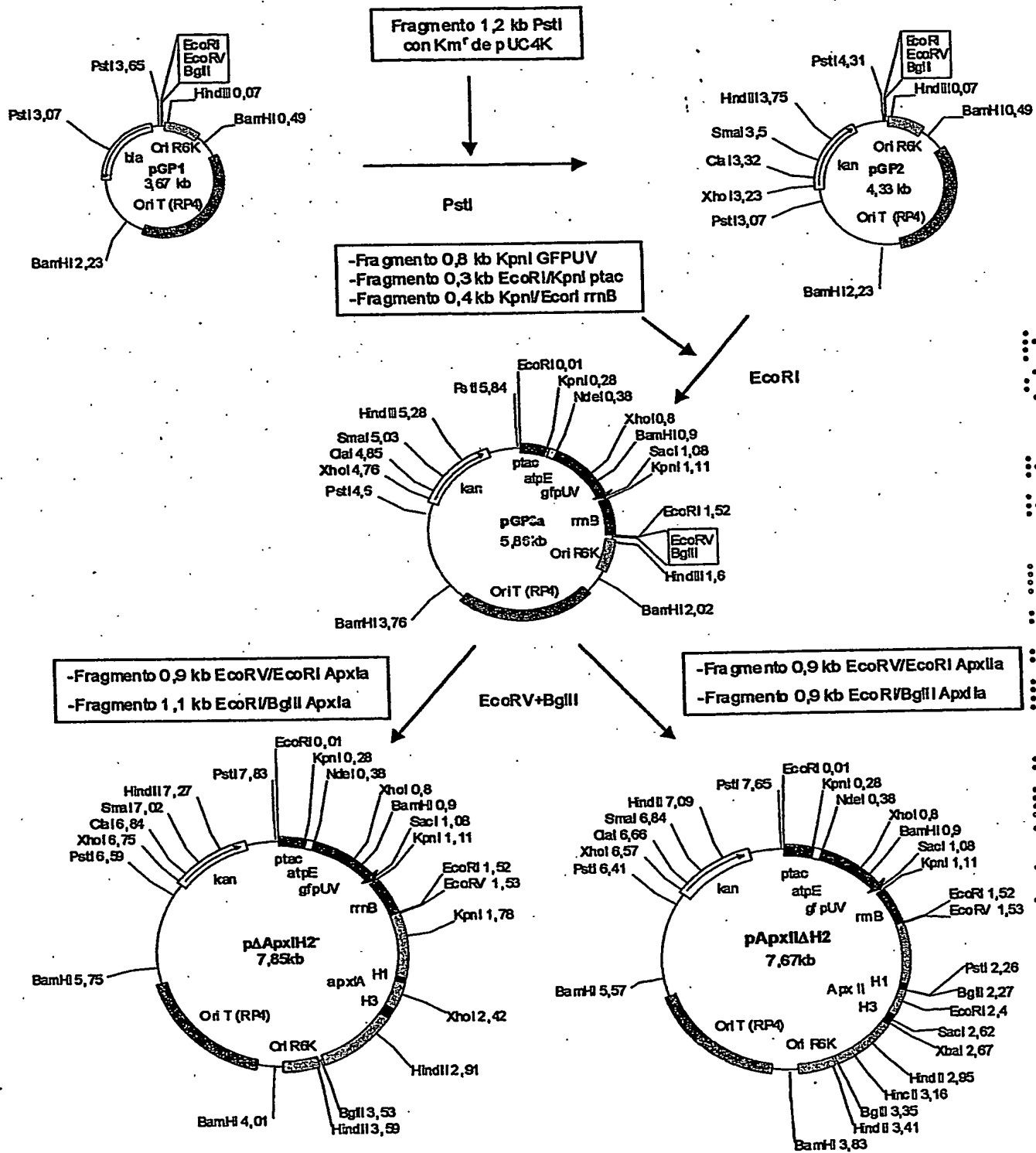
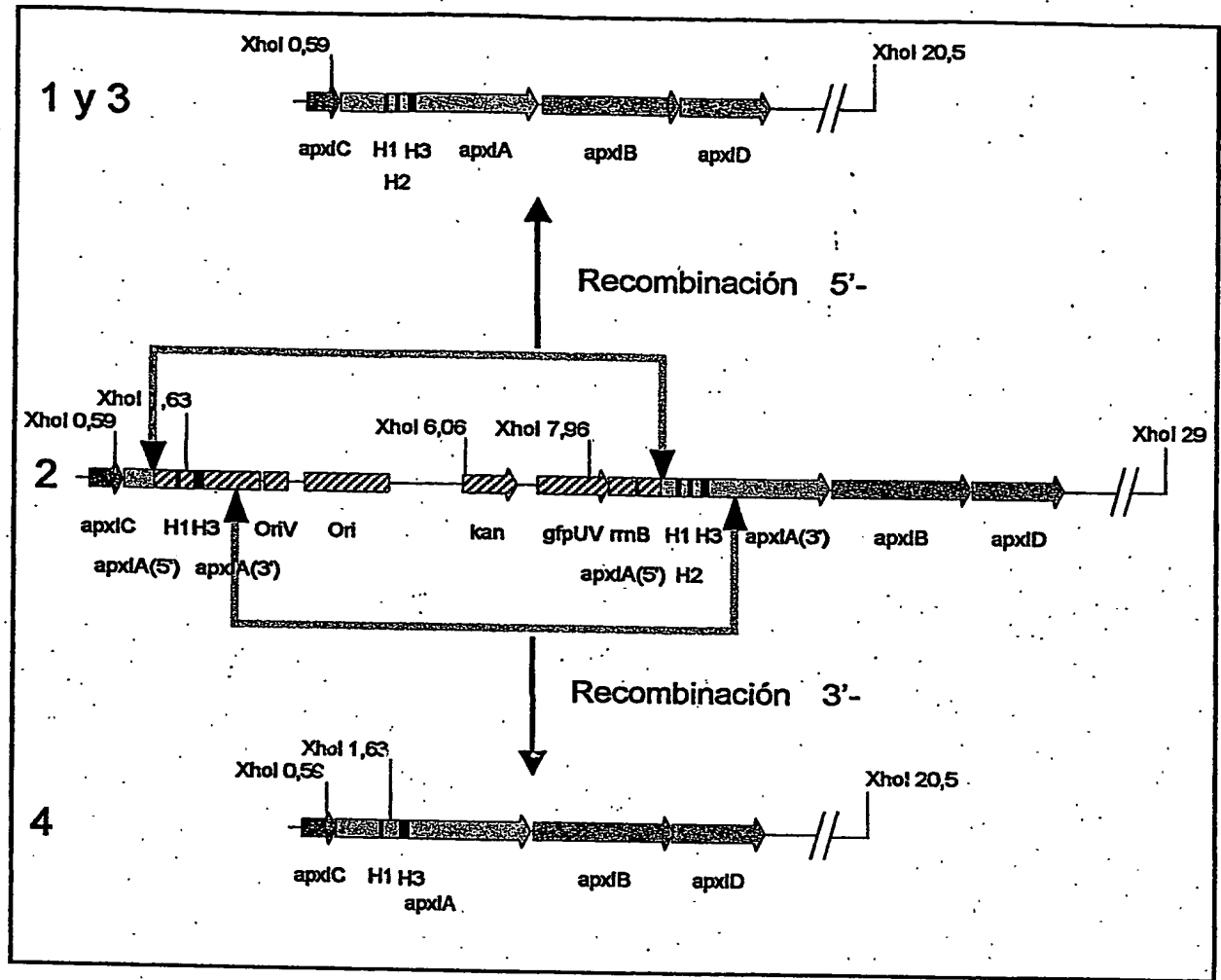
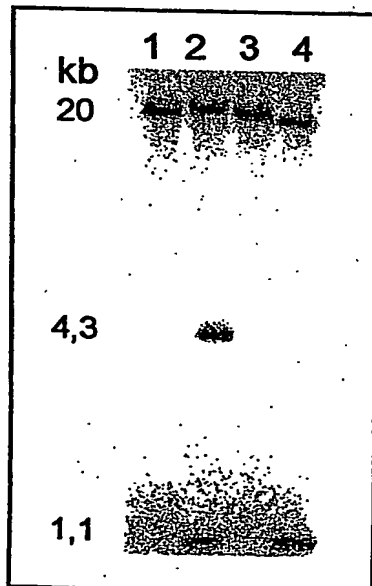


Figura 2

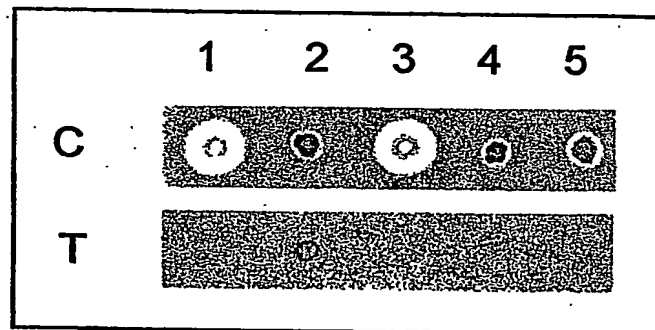


**B**

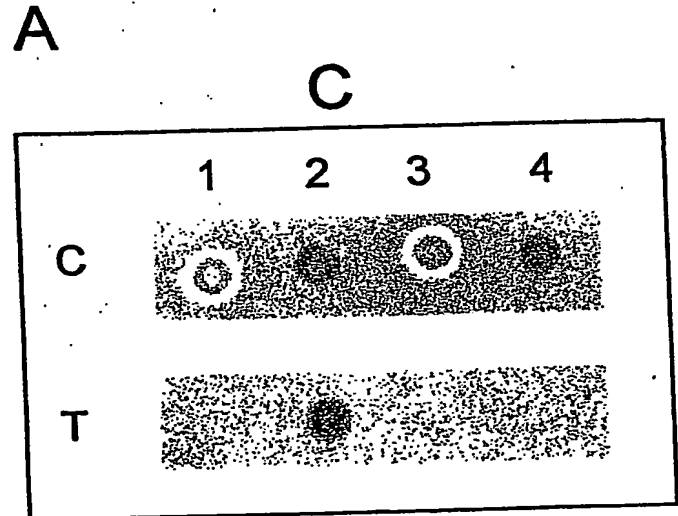
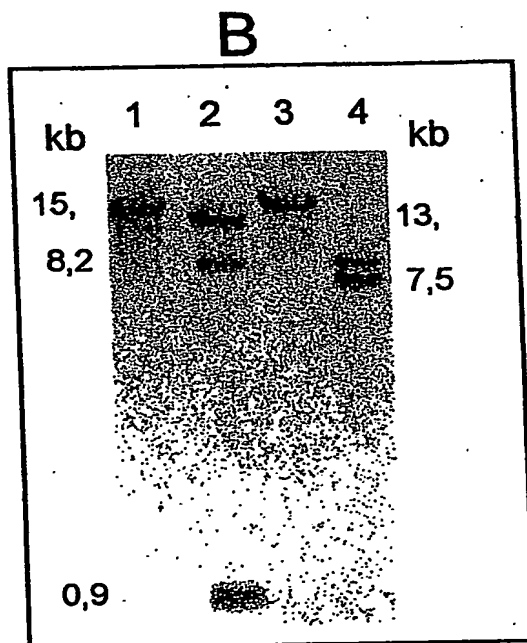
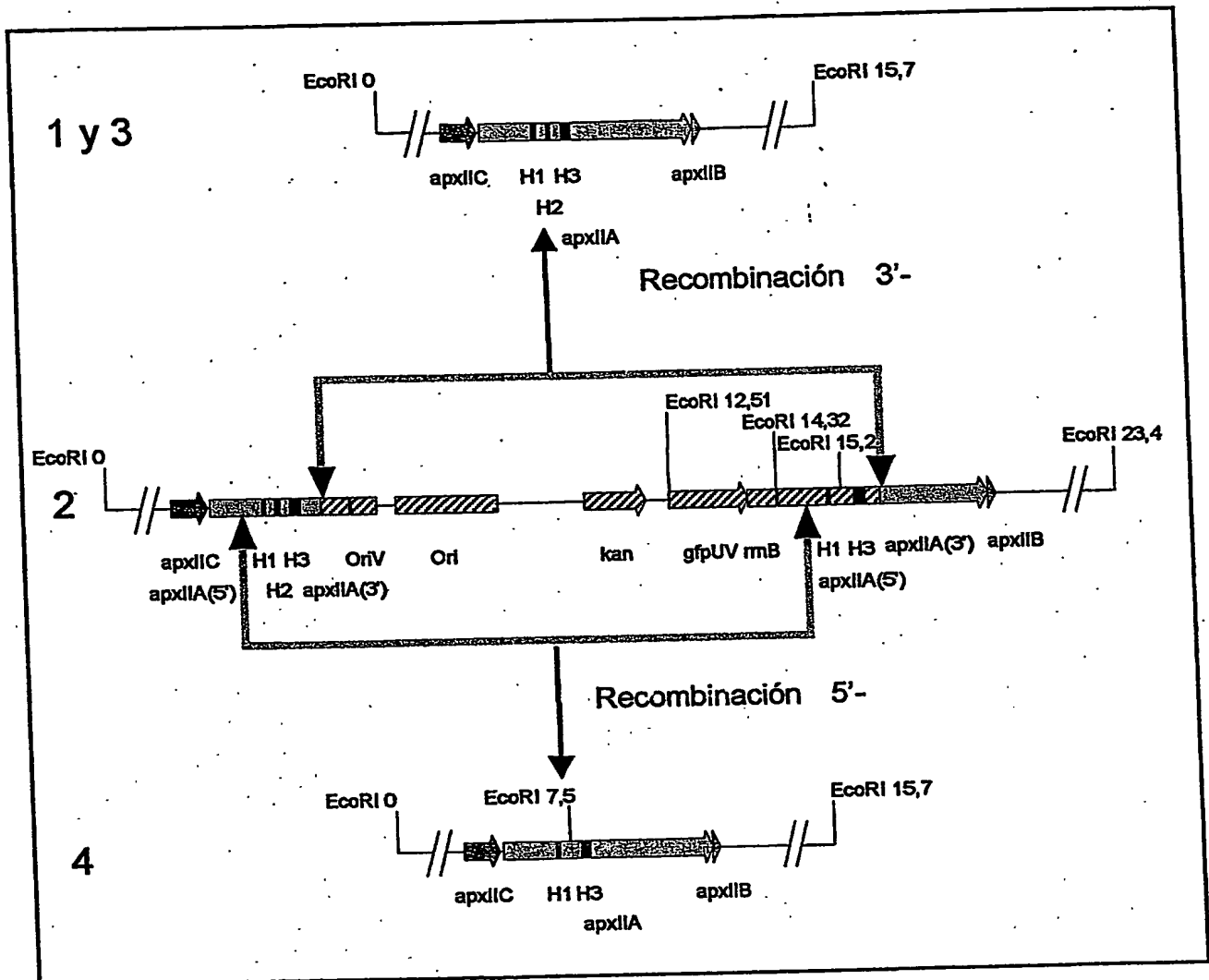
**A**



**C**



**Figura 3**



**Figura 4**

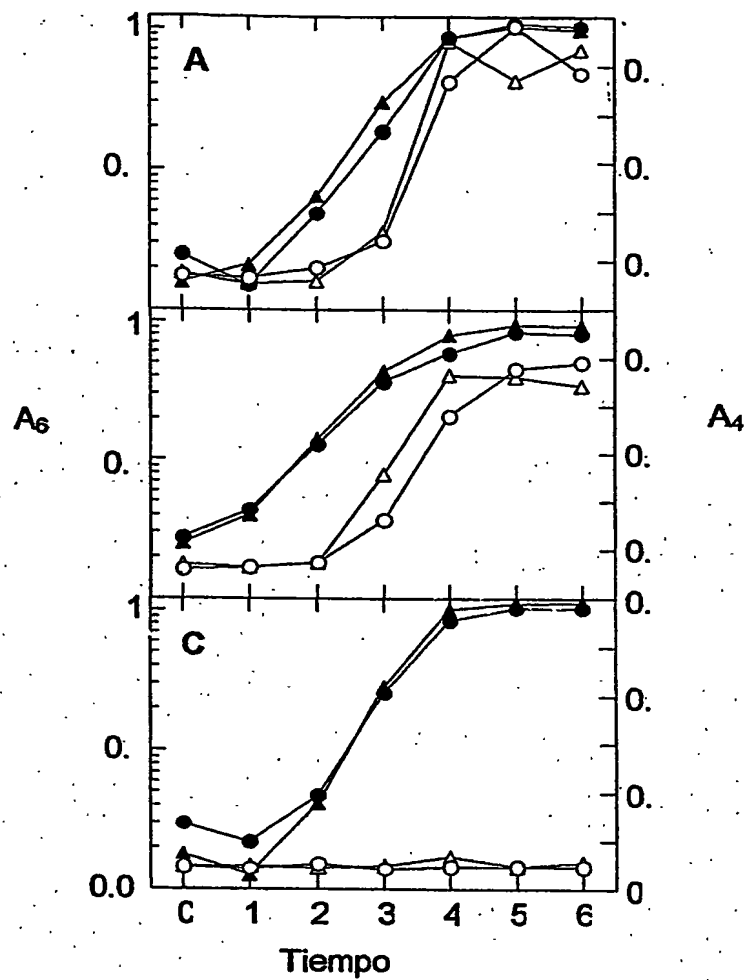
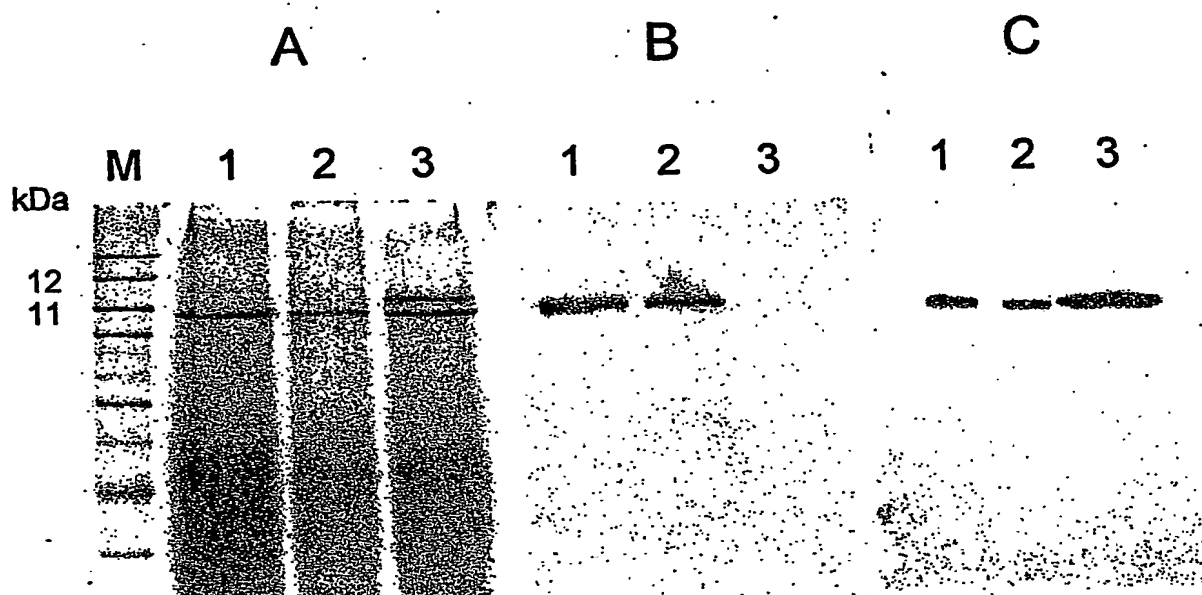


Figura 5





**Figura 6**